

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008 ~ 2009

課題番号：20770147

研究課題名 (和文) DT40 細胞でニワトリ B リンパ球細胞特異的な組換え因子を探索する

研究課題名 (英文) Method to enhance gene-targeting efficiency

研究代表者

廣田 耕志 (HIROTA KOUJI)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：00342840

研究成果の概要 (和文)：申請者は、高等真核生物で例外的に標的組換えが効率的に起こることが知られるトリ B リンパ球細胞由来 DT40 細胞株の解析を通じて、標的組換えがどのようなメカニズムで DT40 細胞で高いのか？という謎を解き明かし、この知見を動物や植物と行ったこれまで標的組換えが困難であった細胞に応用できるような技術の開発につなげることを目的として研究を行ってきた。当初計画していた実験で、DT40 細胞の転写因子 (Pax5, Ikaros の 2 種) のノックアウトによる B 細胞系譜からの逸脱に伴う標的組換えの低下や消失は見られなかったことから、DT40 と細胞系譜が変質して標的組換えしなくなった細胞間の transcriptome アプローチでの比較解析は困難となった。ところが、昨年 Blm (ブルーム症候群の原因遺伝子) と Exo1 (エキソヌクレアーゼ) が協力して DNA の組換えの過程で働くことを示す基礎データが海外の複数のグループから報告された。これを受けて、我々は DT40 細胞でこれらの因子を発現させたときに、ある制限酵素 (I-SceI) によって誘導されるタイプの標的組換えが 50 倍から 100 倍程度高まることを見いだした (論文 2、特許出願済)。さらに、Blm-Exo1 による標的組換え率の上昇は、特にミスマッチした配列間の組換えにおいて特に顕著に見られたことから、標的組換えの難しい基質間の組換えに特に有効であることが示唆できた (論文 2)

研究成果の概要 (英文)：Bloom syndrome is caused by inactivation of the Bloom DNA helicase (Blm). To investigate the role of Blm in gene targeting event, we analyzed the chicken DT40 B lymphocyte line. We measured the frequency of gene-targeting induced by an I-SceI-endonuclease-mediated double-strand break (DSB). *BLM*^{-/-} cells showed a severer defect in the gene-targeting frequency, as the number of heterologous sequences increased at the DSB site. Conversely, the overexpression of Blm, even an ATPase-defective mutant, strongly stimulated gene-targeting. Moreover we discovered that Exo1, exonuclease also activates this gene-targeting event collaborating with Blm helicase. In summary, Blm promotes HR between diverged sequences through a novel ATPase-independent mechanism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：相同組換え、標的組換え、DT40、Blm、Exo1、組換え促進法

1. 研究開始当初の背景

ノックアウトマウスを用いた解析は、様々な生命事象における各因子の働きを理解する上で大きな成果を上げてきた。しかし、多くの高等真核生物に導入されたゲノム DNA コンストラクトは、通常ランダムな部位に導入されるので、目的遺伝子をターゲットした欠損を作り出すのは困難であり、数万回のスクリーニングを要する場合も稀ではない。一方、ニワトリ B リンパ球細胞 DT40 細胞株では高頻度に標的組換えが起こることが知られていた。しかしながら、なぜ DT40 で標的組換えが高確率で起こるのか不明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、トリ B リンパ球細胞由来 DT40 細胞株を解析して、その原因を明らかにし、他の高等真核生物細胞でも効率的に標的組換えを誘導する方法を開発することである。

3. 研究の方法

DT40 株において、図 1 に示す gene-targeting 効率を測定するアッセイ系を構築した。このアッセイ系では、I-SceI 制限酵素によって誘導される DNA 2 重鎖切断によって引き起こされる gene-targeting の結果、ネオマイシン耐性遺伝子中のフレームシフト変異が targeting DNA コンストラクトに含まれるネオマイシン耐性遺伝子部分断片によって置き換えられる為、gene-targeting 効率をネオマイシン耐性コロニー数のカウントで測定できる。

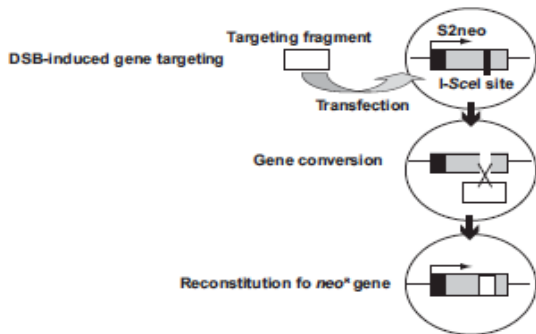


図 1 gene-targeting 効率の測定法

4. 研究成果

このアッセイ系を用いて、野生型と Blm 遺伝子破壊細胞を比較したところ、Blm 遺伝子破壊細胞において、顕著な gene-targeting 効率の低下が見られた。さらに、gene-targeting コンストラクトとして、I-SceI 切断部位において様々な長さのミスマッチを有する DNA を用いると、Blm 遺伝子破壊細胞では、ミスマッチした配列長が長くなるに従って、より顕著な gene-targeting 効率の低下が見られた (図 2)

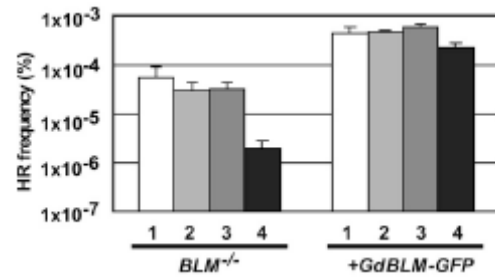


図 2 ミスマッチ配列を有するコンストラクトとの gene-targeting 効率の野生型、Blm-細胞間の gene-targeting 効率の比較。ミスマッチは 1 から 4 に行くに従い長くなる。

一方、細胞において Blm タンパク質を高発現させると、逆に gene-targeting 効率が 50 倍ほど上昇する事が判明した (図 3)。海外の複数グループから Blm ヘリカーゼと Exo1 エクソヌクレアーゼタンパク質が、協調して gene-targeting に必須の相同組換えの初期過程に関与する事が示された。そこで、Exo1 遺伝子の高発現による gene-targeting への影響を検討したところ、Blm と同様の gene-targeting を促進する活性を Exo1 が有する事が示された (図 3)。さらに、Blm, Exo1、両タンパク質の連携につき検討するため、同時高発現を行ったところ、単独の発現と同等レベルの gene-targeting の亢進が見られた (図 3)。この事から、Blm, Exo1 は同一の過程で機能し、gene-targeting を促進し、どちらか一方の高発現で十分の gene-targeting の促進効果がある事が示唆された。

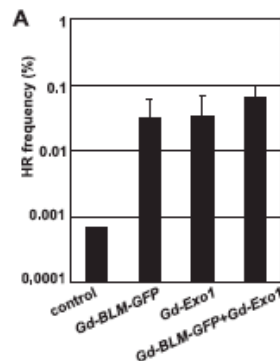


図 3 Blm, Exo1 タンパク質高発現による gene-targeting 効率の上昇

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

1. Hirota, K., Fukuda, T., Yamada, T. and Ohta, K. (2009) Analysis of chromatin structure at meiotic DSB sites in yeasts. *Methods in molecular biology Clifton, N.J.*, **557**, 253-266. 査読有
2. Kikuchi, K., Abdel-Aziz, H.I., Taniguchi, Y., Yamazoe, M., Takeda, S. and Hirota, K. (2009) Bloom DNA helicase facilitates homologous recombination between diverged homologous sequences. *The Journal of biological chemistry*, **284**, 26360-26367. 査読有
3. Hirota, K. and Ohta, K. (2009) Cascade transcription of mRNA-type long non-coding RNAs (mlonRNAs) and local chromatin remodeling. *Epigenetics*, **4**, 5-7. 査読有
4. Hirota, K. and Ohta, K. (2009) Transcription of mRNA-type long non-coding RNAs (mlonRNAs) disrupts chromatin array. *Communicative & integrative biology*, **2**, 25-26. 査読有
5. Hirota, K., Miyoshi, T., Kugou, K., Hoffman, C.S., Shibata, T. and Ohta, K. (2008) Stepwise chromatin remodelling by a cascade of transcription initiation of non-coding RNAs. *Nature*, **456**, 130-134. 査読有
6. Fujino, T., Hirota, K., Ohta, K. and Tahara, T. (2008) In-cell Viscosity Measurement Using a Fluorescence Up-conversion Microscope. *Chemistry Letters*, **37**, 1240. 査読有
7. Hirota, K., Mizuno, K., Shibata, T. and Ohta, K. (2008) Distinct chromatin modulators regulate the formation of accessible and repressive chromatin at the fission yeast recombination hotspot ade6-M26. *Molecular biology of the cell*, **19**, 1162-1173. 査読有
8. Sasanuma, H., Hirota, K., Fukuda, T., Kakusho, N., Kugou, K., Kawasaki, Y., Shibata, T., Masai, H. and Ohta, K. (2008) Cdc7-dependent phosphorylation of Mer2 facilitates initiation of yeast meiotic recombination. *Genes & development*, **22**, 398-410. 査読有

9. Yamada, K., Hirota, K., Mizuno, K., Shibata, T. and Ohta, K. (2008) Essential roles of Snf21, a Swi2/Snf2 family chromatin remodeler, in fission yeast mitosis. *Genes & genetic systems*, **83**, 361-372. 査読有

10. Hikiba, J., Hirota, K., Kagawa, W., Ikawa, S., Kinebuchi, T., Sakane, I., Takizawa, Y., Yokoyama, S., Mandon-Pepin, B., Nicolas, A. *et al.* (2008) Structural and functional analyses of the DMC1-M200V polymorphism found in the human population. *Nucleic acids research*, **36**, 4181-4190. 査読有

[学会発表] (計 4 件)

1. 分子生物学会 (BMB2008)
2008 年 12 月 12 日 Hirota, K., Miyoshi, T., Kugou, K., Ohta, K. Chromatin regulation of meiotic recombination and stress-induced gene activation.
2. International Symposium DNA Damage Response and Repair Mechanisms
2009 年 4 月 20-23 日
Koji Kikuchi, H. Ismail Abdel-Aziz, Mitsuyoshi Yamazoe, Kouji Hirota, Shunichi Takeda The Bloom DNA helicase facilitates homologous recombination between diverged sequences
3. AGENDA GeneExpression Systems of USA Presents Epigenetics, Sequencing & SNIps-2009 Meeting 2009 7 月 13 - 14 日 Kouji Hirota Non coding RNAs disrupt chromatin array
4. 内藤コンファレンス Nuclear Dynamics and RNA 2009 6 月 23 - 26 日 Kouji Hirota Transcription of mRNA-type long non-coding RNAs (mlonRNAs) disrupts chromatin array

[図書] (計 3 件)

1. 基礎の基礎 細胞工学 2010 年 1 月号
14-20 ページ 廣田耕志、武田俊一
2. mlonRNA 仮説 ノンコーディング RNA 転写による新規クロマチン構造変化機構
化学と生物 2009 5 月号
296-298 ページ 廣田耕志、太田邦史
3. クロマチン再編成をうけて遺伝子活性化にかかわる mRNA 型長鎖ノンコーディング RNA 蛋白質核酸酵素 2009
No6 Vol154 735-741 ページ
廣田耕志、太田邦史

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：遺伝的に改変された細胞を製造する
方法

発明者：武田 俊一，廣田 耕志

権利者：独立行政法人農業生物資源研究所

種類：特許

番号：特願 2009-138902

出願年月日：平成 21 年 6 月 10 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://rg4.rg.med.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣田 耕志 (HIROTA KOUJI)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：00342840